

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2003-500066
(P2003-500066A)

(43) 公表日 平成15年1月7日(2003.1.7)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M 4 B 0 2 9
G 0 1 N 33/53		33/543	5 0 1 D 4 B 0 6 3
33/543	5 0 1	33/58	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-620126(P2000-620126)
(86) (22) 出願日 平成12年5月25日(2000.5.25)
(85) 翻訳文提出日 平成13年11月26日(2001.11.26)
(86) 国際出願番号 P C T / E P 0 0 / 0 4 7 9 1
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 0 7 1 7 4 9
(87) 国際公開日 平成12年11月30日(2000.11.30)
(31) 優先権主張番号 1 9 9 2 3 9 6 6 . 5
(32) 優先日 平成11年5月25日(1999.5.25)
(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

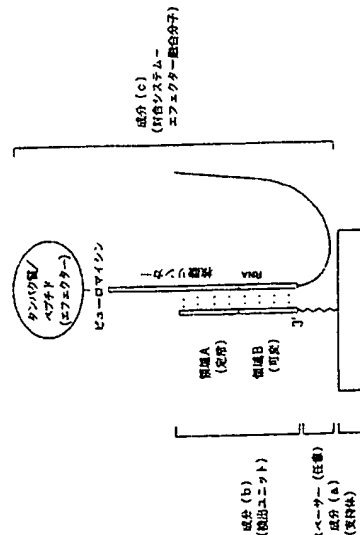
(71) 出願人 イクツィリオン・ゲーエムベーハー・ウン
ト・コー・カーゲー
ドイツ連邦共和国65926 フランクフル
ト・アム・マイン
(72) 発明者 ベーケンカンフ、ディルク
ドイツ連邦共和国デー-59368 ヴェルネ、
アム・ベリンクホルツ 18
(72) 発明者 ホッペ、ハンス-ウルリヒ
ドイツ連邦共和国デー-85416 ランゲン
バッハ、マイセンシュラーセ 14
(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子相互作用の研究用検出システムおよびその製造および使用

(57) 【要約】

本発明は、(a) 支持体 (成分 (a)) および (b) その支持体に結合した少なくとも一つの検出ユニット (成分 (b))、好ましくは、核酸であって、定常構造を有する領域 (A) および領域 (A) に隣接し且つ可変構造を有する領域 (B) を含む該検出ユニット (成分 (b)) を含む検出システム、試料中の個々の成分を分別する方法であって、少なくとも一つの試料成分を、適当な条件下において、支持体に結合した少なくとも一つの検出ユニット (成分 (b)) に結合させる該方法、並びに試料の核酸および/またはタンパク質を発見するおよび/または識別するまたは特性決定するための、または細胞性または人工の結合パートナーを発見するおよび/または識別するための、本発明の検出システムおよび本発明の方法の使用に関する。



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出システムであって、

(i) 支持体(成分(a))および

(ii) 該支持体に結合した少なくとも一つの検出ユニット(成分(b))であって、定常配列を有する領域(A)および領域(A)に隣接し且つ可変配列を有する領域(B)を含む対合システムを包括的に含む上記検出ユニット、および

(iii) それに結合し且つ該検出ユニット(成分(b))に相補的な配列を含む対合システム-エフェクター融合分子(成分(c))を含む検出システム。

【請求項2】 領域(A)が、長さ5～約80ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、好ましくは、5～約30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、そして特に、10～約30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である請求項1に記載の検出システム。

【請求項3】 領域(B)が、長さ5～30、特に、5～10、好ましくは、7～8ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である請求項1および2のどちらかに記載の検出システム。

【請求項4】 ヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド(d)、リボヌクレオチド(r)または2-ヒドロキシメチルリボヌクレオチド(hmr)である請求項1～3に記載の検出システム。

【請求項5】 ヌクレオチド類似体が、p-RNA、CNAまたはPNAモノマーである請求項2に記載の検出システム。

【請求項6】 領域(A)が、ポリT鎖、好ましくは、T₇₋₁₅鎖を含む請求項1～4のいずれかに記載の検出システム。

【請求項7】 成分(c)が、核酸-タンパク質受容体融合分子および/または核酸-タンパク質融合分子、特に、核酸-ピューロマイシン誘導体および/または核酸-ピューロマイシン-タンパク質融合分子より選択される請求項1～6のいずれかに記載の検出システム。

【請求項8】 支持体が、セラミック、金属、特に、半導体、貴金属、ガラス、プラスチック、結晶性材料、または支持体、特に、該材料の薄層、若しくは

セルロースのような（生体）分子フィラメント、構造タンパク質、または上記材料の組合せから構成されている請求項1～7のいずれかに記載の検出システム。

【請求項9】 検出システムが、電子チップ上に組み立てられている請求項1～8のいずれかに記載の検出システム。

【請求項10】 請求項1～9のいずれかに記載の検出システムを製造する方法であって、

(i) 定常配列を有する領域(A)および領域(A)に隣接し且つ可変配列を有する領域(B)を含む検出ユニット(成分(b))を支持体(成分(a))に結合することによるアレイの製造であって、ここにおいて、それぞれのアレイ位置は、特定の領域Bを有する検出ユニットに割り当てることができる、および

(ii) 該検出ユニット(成分(b))と、該検出ユニット(成分(b))に相補的な配列を含む対合システムーエフェクター融合分子(成分(c))とのハイブリダイゼーションを含む上記方法。

【請求項11】 対合システムーエフェクター融合分子を含む溶液中の個々の成分を分別し且つ識別する方法であって、

(i) 対合システムーエフェクター融合分子ライブラリー(成分(c))ライブラリー、好ましくは、フサジーン(fusagene)ライブラリーの作成、

(ii) 成分(a)および領域(B)が可能な並べ換えを全て含む成分(b)を含むアレイ上の対合システムーエフェクター融合分子(成分(c))のハイブリダイゼーションであって、個々の成分(b)それぞれを一つのアレイ位置に具体的に割り当ててを可能にするハイブリダイゼーション、

(iii) 成分(b)および成分(c)の複合体が形成されているアレイ位置の識別、

(iv) (iii)で識別される成分(b)および成分(c)の複合体の特性決定を含む上記方法。

【請求項12】 長さ5～80ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、好ましくは、5～30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体、そして特に、10～30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の領域(A)を有する成分(b)

を用いる請求項10および11のどちらかに記載の方法。

【請求項13】 長さ5～30、好ましくは、7～8ヌクレオチドの領域（B）を有する成分（b）を用いる請求項10～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】 ポリT鎖、好ましくは、 T_{7-15} 鎖、またはリボソーム結合部位に相補的な鎖から構成される領域（A）を用いる請求項10～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】 支持体が、セラミック、金属、特に、半導体、貴金属、ガラス、プラスチック、結晶性材料、または支持体、特に、該材料の薄層、若しくはセルロースのような（生体）分子フィラメント、構造タンパク質、または上記材料の組合せから構成されている請求項10～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】 前記方法を電子チップ上で行う請求項10～15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】 試料成分を、支持体に結合した検出ユニットに、電界によって成分（b）としてまたは成分（c）として結合する請求項10～16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 用いられる成分（c）が、核酸および／またはその類似体、好ましくは、DNA、RNA、特に、mRNA、RNA-ピューロマイシン誘導体およびタンパク質から構成される対合システム-エフェクター融合分子である請求項10～17のいずれかに記載の方法。

【請求項19】 [空隙 (l a c u n a)] 中において、試料の少なくとも一つのRNA-タンパク質融合分子を、支持体に結合し且つ式 $3' - (X)_{7-8} - (T_{7-15}) - 5'$ （式中、Xは、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアノシンまたはシトシンより選択される任意のヌクレオチドである）を有する少なくとも一つの核酸に、好ましくは、電界によって結合し、そして適宜、追加の工程において、結合していないまたは特異的に結合していない核酸を、好ましくは、逆の極性を有し且つ第一工程の場合より低い電界強さを有する電界によって除去する請求項10～18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】 第一工程において、適当な核酸リンカー、好ましくは、 dA_2, dC, dC リンカーを、試料のRNA集団に、化学的にまたは適当なりガーゼ

、好ましくは、T4 DNAリガーゼによって融合した後、翻訳し、続いてRNA-リンカー-タンパク質融合の形成を引き起こし、第二工程において、RNA-リンカー-タンパク質融合分子を、好ましくは、式 $3'-(X)_{7-8}-(T_{27}GG)-5'$ （式中、Xは、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアノシンまたはシトシンより選択される任意のヌクレオチドである）を有する本発明の検出システムの核酸に、好ましくは、電界によって結合し、そして適宜、追加の工程において、結合していないまたは特異的に結合していない核酸を、好ましくは、逆の極性を有し且つ第二工程の場合より低い電界強さを有する電界によって除去する請求項10～19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】 成分(c)の特定のエフェクターユニットに親和性を有する一つまたはそれ以上の結合パートナー(成分(d))の相互作用を識別する方法であって、

(i) 対合システム-エフェクター融合分子アレイと、少なくとも一つの成分(d)を含む分析されるべき物質混合物とのインキュベーション、

(ii) 成分(b)、成分(c)および成分(d)の複合体が形成されているアレイ位置の識別、

(iii) (ii)で識別される成分(b)、成分(c)および成分(d)の複合体の特性決定を含む上記方法。

【請求項22】 少なくとも一つの試料成分、特に、試料の核酸および／またはタンパク質を発見するおよび／または識別するおよび／または特性決定するための、または細胞性または人工の結合パートナー、好ましくは、タンパク質、ペプチド、核酸、化学的活性物質、好ましくは、有機化合物、薬理的活性化合物、生産物保護物質、毒素、特に、毒物、発癌性および／または催奇形性物質、除草剤、抗真菌剤または殺虫剤を発見するおよび／または識別するための請求項21に記載の方法。

【請求項23】 少なくとも一つの成分(d)を直接的に標識する請求項21および22のどちらかに記載の方法。

【請求項24】 少なくとも一つのエフェクター結合成分(d)を、例えば

、抗体のような標識された特異的結合パートナーを用いて検出する請求項21～23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】 工程(ii)によるエフェクターと成分(d)との間の相互作用を、例えば、補因子、補酵素、活性化物質または阻害物質のような、相互作用に影響を与える追加の物質を加えることによって変更する請求項21～24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】 酵素活性パターンを決定する請求項21～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】 検出システム(成分(a)～(c))および成分(d)を含む結合体。

【請求項28】 成分(d)がフサジーンである請求項27に記載の結合体。

【請求項29】 成分(d)が、タンパク質、ペプチド、特に、転写因子、受容体、または例えば、キナーゼ、ホスファターゼ、GTPアーゼ、エステラーゼ、グリコシラーゼ、リパーゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ、ヒドロラーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼのような酵素であって、それらの基質または調節物質と一緒にものである請求項27および28のどちらかに記載の結合体。例えば、誘導物質、cAMPまたはcGMPのような二次メッセンジャー、および／または化学的活性物質、好ましくは、有機化合物、薬理的活性化合物、ホルモン、生産物保護物質、毒素、特に、毒物、発癌性および／または癌奇形性物質、除草剤、抗真菌剤および／または殺虫剤など。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、支持体 (support) (成分 (component) (a))、およびその支持体に結合して且つ定常領域 (constant region) (A) および隣接する可変領域 (variable region) (B) を含む検出ユニット成分 (b)、および領域 (A) および (B) に相補的な領域および適宜、適当なリンカーによってそれに結合したエフェクターユニット (effector unit) を含む成分 (c) を含む検出システム (図1) に関し、本発明は、更に、このような検出システムを製造する方法、およびそれら検出システムを用いることによって分子相互作用を研究する方法に関する。

【0002】

ヒト細胞において、概して、細胞の存在状態を特性決定する最大約30000までの遺伝子は活性である。細胞の状態は、例えば、癌細胞の場合は増加した細胞分裂、または概して、疾患状態の場合は変更された代謝活性を示すことがありうる。遺伝子の活性は、mRNAによって転写産物としてまたは該当するタンパク質によって翻訳産物として決定することができる。したがって、細胞のmRNAまたはタンパク質のプロフィールは、その存在状態を反映している。

【0003】

ごく最近、健康なまたは不健全な (diseased) 細胞のタンパク質プロフィールに基づく特性決定は、疾患を研究し且つ薬理学的の活性化合物を発見するのに極めて重要になってきている。細胞のタンパク質プロフィールを特性決定することを可能にするいろいろな方法は、既に開発されている。

【0004】

細胞中のタンパク質プロフィールを直接的に特性決定するためには、細胞タンパク質を分別する必要がある。有効な方法は、例えば、二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (2DE) である。この場合、タンパク質を、それらの等電点 (isoelectric point: IP) によって一次元でおよびそれらの分子量によって二次元で分別する。次に、それらタンパク質を、典型的な2Dゲル中にスポットして染色される約1000~2000種類のタンパク質を染色す

ることによって2Dゲル中で可視化する。その結果は、それぞれの細胞に有意であり且つ細胞の具体的な状態をタンパク質レベルで反映するタンパク質パターンまたはプロフィールである。細胞のタンパク質はそれぞれ、2Dゲル上にそのタンパク質に特異的な位置を有するので、細胞に関して、結果的には、微生物全体に関して“プロテオームマップ”を作成することは可能である。例えば、疾患経過中の細胞の変更の分子的原因を決定するためには、健康なおよび不健全な細胞のタンパク質プロフィールを、可能性のある相違を検出するために比較する。この比較は、例えば、適当な計算機によって自動的に行うことができる（例えば、Wilkins, M.R. et al. (eds) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer Verlag, Heidelberg (1997) または Humphrey-Smith, I. et al. (1997) *Electrophoresis* 18, 1216-1242 を参照されたい）。しかしながら、この方法は、検出されるタンパク質の追加の分析のために、それらタンパク質をタンパク質レベルで配列決定することが必要であるという実質的な欠点を有し、しかもこの手順は、今なお時間がかかり且つ高価である。

【0005】

細胞のタンパク質プロフィールにおいて可能性のある相違を決定するもう一つの方法は、“アレイ (arrays)”、すなわち、マトリックスシステム (matrix systems) を用いる。アレイは、分析法および診断法における分析物の同時決定に重要な役割を果たす固定された検出種の配列である。例は、核酸アレイ（例えば、Southern et al. *Genomics* (1992) 13, 1008; 米国特許第5,632,957号、WO97/27317号またはEP-A1-0543550号を参照されたい）またはペプチドアレイ（Fodor et al., *Nature* 1993, 364, 555）である。例えば、WO96/01836号は、異なった配列のDNA分子のアレイを記載しているが、これは、遺伝子部分を検出するのに役立つので、例えば、病原性細菌の診断をもたらす。特許公報U.S. 5,605,662号、WO96/01836号、U.S. 5,632,957号およびWO97/12030号は、アレイの形の特定のアドレス可能な部位への、核酸またはタンパク質のような生体化合物の特異的結合反応を電子制御可能な方法で行うのに用いることができる半導体チップおよび方法を記載している。例えば、試料中の核

酸を、半導体チップ上の核酸アレイに電界 (electric field) によってハイブリッド形成させた後、結合していないまたは特異的に結合していない核酸を、電界の極性を単純に逆にすることによって除去する。ここで、単一塩基対の誤対合 (mismatch) を電界強さの正確な調整によって検出することが可能である。

【0006】

本発明の目的は、対合システム－エフェクター融合分子 (pairing system-effector fusion molecules) の集団から組み立てられていて且つその集団を識別し且つ特性決定するのを助けることができる検出システムを提供することであった。本発明のもう一つの目的は、エフェクター結合パートナー相互作用を研究する方法である。

【0007】

驚くべきことに、現在、それぞれの場合に、定常配列 (constant sequence) を有する領域 (A) および領域 (A) に隣接し且つ可変配列 (variable sequence) を有する領域 (B) を含む検出ユニットの適当な集合は、対合システム－エフェクター融合分子への特異的ハイブリダイゼーションによって、エフェクタープロファイルを特性決定後、エフェクター結合パートナー相互作用を識別するのに適しているということが判明している。

【0008】

本発明は、検出システム (図1) であって、

(i) 支持体 (成分 (a)) および

(ii) その支持体に結合した少なくとも一つの検出ユニット (成分 (b))、好ましくは、対合システムであって、定常配列を有する領域 (A) および領域 (A) に隣接し且つ可変配列を有する領域 (B) を含む検出ユニット、および

(iii) それに結合し且つ検出ユニット (成分 (b)) に相補的な配列を含む対合システム－エフェクター融合分子 (成分 (c)) を含む検出システムに関する。

【0009】

好ましくは、複数の検出ユニット (成分 (b)) は、支持体 (成分 (a)) 上

に、それぞれのアレイ位置が成分 (b) の規定の可変領域Bに割り当てられうるアレイを形成する。そのアレイ表面上の異なった検出ユニットから開始して、特定位置特異的検出システム (成分 (a) ~ (c)) を組み立てることができる。

【0010】

検出ユニット (成分 (b)) という用語は、本発明によれば、特に、ペントース、好ましくは、ペントピラノースまたはペントフラノースを含有する核酸またはそれらの類似体 (analog s) を意味する。概して、ペントースは、リボース、アラビノース、リキソースまたはキシロースより選択される。適当な核酸またはそれらの類似体の例は、DNA、RNA、特に、mRNAまたはp-RNA (ピラノシルRNA, 例えば、WO99/15539号を参照されたい)、アミノシクロヘキシル核酸 (CNA, 例えば、WO99/15509号を参照されたい)、ペプチド核酸 (PNA, 例えば、WO92/20702号 または Science (254), 1999, 1497-1500 を参照されたい)、または例えば、WO98/25943号に記載のような非らせん超分子ナノシステムである。

【0011】

これに関連して、検出ユニット (成分 (b)) は、その領域AおよびBに相補的である成分 (c) の領域と特異的にハイブリッド形成する。成分 (c) の例は、特に、核酸-タンパク質受容体誘導体、好ましくは、核酸-ピューロマイシン誘導体、または核酸-タンパク質融合分子のようなフサジーン (fusagen e)、特に、核酸-ピューロマイシン-タンパク質融合分子である。具体的には、核酸RNAおよびDNAから作られる、好ましくは、ピューロマイシン (pur omycin) およびタンパク質に融合した融合分子が好ましい。本発明によるタンパク質という用語は、例えば、グリコシル化、リン酸化、ハロゲン化、脂質エステル化されたアミノ酸等のような翻訳後修飾または化学修飾されたアミノ酸、更には、より短いペプチドアミノ酸配列から合成されるタンパク質またはタンパク質構造を包含する。

【0012】

“定常配列” (領域A) という用語は、本発明によれば、全ての検出ユニット (成分 (b)) において一致する配列、好ましくは、RNA、DNAまたはcD

NA基準の核酸配列、さもないと、例えば、p-RNA、CNAまたはPNA配列のような核酸類似体の配列を意味する。

【0013】

“可変配列”（領域B）という用語は、本発明によれば、配列、好ましくは、核酸配列を意味し、具体的な領域B中のその配列は、異なるが知られている。核酸の可変配列は、例えば、個々のヌクレオチドのランダム変化（random events）または並べ換え（permutation）によって形成されるその核酸配列である。

【0014】

領域（A）および／または領域（B）の長さは、好ましくは、互いに独立して、領域（A）については約5～約80ヌクレオチド、好ましくは、約5～約30ヌクレオチド、そして特に、約10～約30ヌクレオチド、そして領域（B）については、特に、7～8ヌクレオチドであり、特に好ましい態様におけるヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド（d）、リボヌクレオチド（r）または2-ヒドロキシメチルリボヌクレオチド（hmr）である。下の態様において、核酸配列は、それらの具体的な主鎖を含むことなく述べられている。したがって、述べられる核酸配列は、いずれの場合にも、（d）、（r）および（hmr）の態様を含む。更に、本発明によるRNAは、リボヌクレオチドからのみならず、2-ヒドロキシメチルリボヌクレオチドからも合成されてよい。

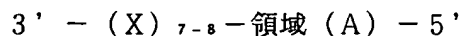
【0015】

タンパク質集団、例えば、細胞のタンパク質集団のタンパク質プロフィールは、例えば、適当な核酸-タンパク質融合によってタンパク質を選択することにより、うまく特性決定される。例えば、WO98/31700号は、タンパク質受容体、例えば、ピューロマイシンが、核酸、好ましくは、mRNAに適当なリンカーによって結合しているシステムを記載している。これは、該当するタンパク質へのmRNA翻訳が終了する直前に、合成されるタンパク質をそのエンコーディングmRNAに共有結合させ、したがって、それをより詳細に特性決定することを可能にする。配列が知られているリンカーは、本発明の核酸の領域（A）への結合領域として特に好都合に適している。例えば、ポリT₁₂鎖を、例えば、配

列A₂₇CCを有する核酸-タンパク質融合のリンカーへの結合のための領域(A)として用いることは可能である。核酸-タンパク質融合を生じさせるためには、そのリンカーは、タンパク質受容体、例えば、特に適しているピューロマイシンのようなtRNAアミノ酸類似体を含有してよい。本発明に用いることができる同じようなシステムの例は、DE19646372C1号、WO98/16636号、WO91/05058号、U.S. 5,843,701号、WO93/03172号またはWO94/13623号に記載されている。

【0016】

例えば、核酸融合、特に、核酸-ピューロマイシン-タンパク質融合(フサジーン)のような対合システム-エフェクター融合分子の集団のいろいろな成分を全て包含することができるためには、検出ユニット(成分(b))の領域(B)の可変配列は、可能な並べ換えを全て含有すべきである。可変領域(領域B)の好ましく用いられる長さは、この場合、経験から分かるように、原核細胞で比較的低く、真核細胞で比較的高い集団のコンプレキシティーに依る。ヒト細胞の場合、例えば、約30000の遺伝子が活性であるので、対合システム-エフェクター融合分子を全て含有するアレイの場合、並べ換えられた配列中の7~8ヌクレオチドの長さを有する領域B核酸配列は、ヒト細胞の活性遺伝子を全て包含するのに充分である。nマー(n-mer)オリゴヌクレオチドに可能な並べ換えの数は、知られているように4ⁿであり、ここにおいて、nはオリゴヌクレオチドのヌクレオチド数である。したがって、ヒト細胞の全ての活性遺伝子の識別に関して、支持体に結合する核酸が好ましく、それは、次の式：



(式中、Xは、アデノシン、グアノシン、シトシン、チミジンまたはウラシルより選択される任意のヌクレオチドである)

を有する。

【0017】

“支持体”という用語は、本発明によれば、材料、特に、固体、さもないとゲル様状態で存在する半導体から成るチップ材料を意味する。適当な支持体材料の例は、セラミック、金属、特に、半導体、貴金属、ガラス、プラスチック、結

晶性材料または支持体、特に、それら材料の薄層 (crystalline materials or thin layers of the support, in particular of said materials)、またはセルロースのような(生体)分子フィラメントおよび構造タンパク質である。EP-A1-0543550号またはWO99/15893号、そして特に、U. S. 5, 605, 662号、WO96/01836号、U. S. 5, 632, 957号またはWO97/12030号に記載の支持体システムが好ましいが、それは、これらが、アレイの形の特定のアドレス可能な部位への、核酸の特異的結合反応を電子制御可能な方法で行う場合に用いることができる半導体チップを製造するのに用いることができるためである。これは、特異的に分別されるべき試料の核酸集団を、特に好都合な方法で、半導体チップ上の本発明の核酸を含む核酸アレイに電界によってハイブリッド形成させた後、結合していないまたは特異的に結合していない核酸を、電界の極性を単純に逆にすることによって除去することを可能にする。したがって、本発明の検出システムの特に好ましい態様は、電子チップである。

【0018】

その支持体は、概して、共有結合によって、多かれ少なかれ、共有結合によって、超分子によってまたは物理的に、更には、磁気によって (A.R. Shepard et al. (1997) Nucleic Acids Res., 25,3183-3185, No.15)、電界中でまたはモレキュラーシープによって、好ましくは、U. S. 5, 605, 662号、WO96/01836号、U. S. 5, 632, 957号、WO97/12030号またはWO99/15893号に記載の方法によって装填されている。

【0019】

本発明は、更に、対合システム-エフェクター融合分子アレイ、例えば、フサジーンアレイを製造する方法であって、次の処理工程

(i) 定常配列を有する領域(A)および領域(A)に隣接し且つ可変配列を有する領域(B)を含む検出ユニット(成分(b))を支持体(成分(a))に結合することによるアレイの製造であって、ここにおいて、それぞれのアレイ位置は、特定の領域Bを有する検出ユニットに割り当てることができる、および

(ii) その検出ユニット (成分 (b)) と、その検出ユニット (成分 (b)) に相補的な配列を含む対合システム-エフェクター融合分子 (成分 (c)) とのハイブリダイゼーションを含む方法に関する。

【0020】

例えば、フサジーンライブラリー (成分 (c)) の作成のような、成分 (c) の製造は、WO 98/31700号または Roberts and Szostak (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1997) にしたがって行うことができる。

【0021】

本発明の方法において、アレイは、例えば、別々の細胞中において、空間的に隔てられた成分 (b) および成分 (c) を含む二つ以上の検出システムを支持体 (成分 (a)) に結合することによって製造される。これに関連して、検出ユニット (成分 (b)) は、支持体表面に直接的に、例えば、吸着によってまたは当業者に知られているスパーサーによって適用することができる。具体的な製造方法は、例えば、EP-A1-0543550号またはWO 99/15893号、そして特に、U. S. 5, 605, 662号、WO 96/01836号、U. S. 5, 632, 957号またはEP-B1-0373203号、WO 97/12030号またはWO 98/31700号に、より詳細に記載されている。

【0022】

検出ユニット (成分 (b)) の領域B中の可能な並べ換えを全て含むアレイが好ましい。

本発明の方法の好ましい態様は、既に本明細書中の前により詳細に記載された検出システムを含む。本発明の特に好ましい方法において、検出システムは、電子チップ上に組み立てられていて、試料成分、例えば、核酸融合は、支持体に結合した検出ユニット (成分 (b))、例えば、相補的配列を含む成分 (c) の核酸領域に、電界によって好都合に結合している。この種類の電子チップおよびその適用についての詳細な説明は、例えば、EP-A1-0543550号またはWO 99/15893号、そして特に、U. S. 5, 605, 662号、WO 96/01836号、U. S. 5, 632, 957号またはWO 97/12030

号に記載されている。

【0023】

好ましい態様において、例えば、適当な核酸リンカー、例えば、A₂₇CCを、第一工程で、試料のmRNA集団に、好ましくは、化学的にまたは適当なりガーゼ、例えば、T4 DNAリガーゼによって融合させ、そのmRNA-リンカー融合を、第二工程で、典型的な式3'-(X)₇₋₈-(T₁₅)-5'を有する検出ユニット(成分(b))の核酸に、好ましくは、電界によって結合する。ここにおいて、Xは、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアノシンまたはシトシンより選択される任意のヌクレオチドである。適宜、追加の工程において、結合していないまたは特異的に結合していない核酸を、好ましくは、逆の極性を有し且つ第一工程の場合より低い電界強さを有する電界によって除去する。

【0024】

本発明は、更に、対合システム-エフェクター融合分子を、好ましくは、複合体混合物(図2)から分別し且つ識別する方法であって、次の処理工程、

(i) 対合システム-エフェクター融合分子ライブラリー(成分(c)ライブラリー)、好ましくは、フサジーンライブラリーの作成、

(ii) (成分(a))および領域(B)が可能な並べ換えを全て含む成分(b)を含むアレイ上の対合システム-エフェクター融合分子(成分(c))のハイブリダイゼーションであって、それぞれの並べ換えは一つのアレイ位置に具体的に割り当てられているハイブリダイゼーション、

(iii) 成分(b)および成分(c)の複合体が形成されているアレイ位置の識別、

(iv) (iii)で識別される成分(b)および成分(c)の複合体の特性決定を含む方法に関する。

【0025】

例えば、フサジーンライブラリー(成分(c))の作成のような成分(c)の製造は、WO98/31700号またはRoberts and Szostak (Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1997)にしたがって行うことができる。

【0026】

この方法の具体的な利点は、検出ユニット（成分（b））の具体的な構築が、成分（c）に相補的な領域が知られていない対合システム－エフェクター融合分子、特に、フサジーンを識別することも可能にするということである。これは、一方では、ストリンジェントハイブリダイゼーションを可能にする対合システムの長さによって、そしてもう一方では、ハイブリダイゼーション特異性（成分（c）の分別と等価である）を調整することができる領域Bの長さによって行われる。

【0027】

検出ユニット（成分（b））および具体的な成分（c）のハイブリダイゼーション中に形成される複合体は、成分（c）の標識付によって検出することができる。更に、例えば、電子チップ（成分（a））を用いる場合、それら複合体は、電極またはその付近での酸化還元過程によってまたはインピーダンスおよび直流の測定値のような物理的パラメーターによって、または金チップの場合、例えば、表面プラズモン共鳴測定値（surface plasmon resonance measurement）によって識別することができる。

【0028】

概して、対合システム－エフェクター融合分子（成分（c））は、個々の識別される複合体から、例えば、温度を上昇させること、局所塩濃度を変化させること、または好ましくは、電子結合パラメーターを調節することによる成分（b）へのハイブリダイゼーションの中断を用いて、逐次的に溶離される。次に、これらフサジーンを、例えば、RT-PCRおよび引き続きのDNA配列決定のような当業者に知られている分子生物学的方法によって特性決定する。

【0029】

その方法は、フサジーンライブラリーを分析するのに好ましく用いられる。例えば、この方法で決定される核酸および／またはタンパク質プロファイルによって、いろいろな細胞または組織試料の状態を分析しおよび／または比較することが可能である。更に、特定の核酸または特定のタンパク質が集団中に存在するかどうか検出することが可能である。いろいろな細胞の可能な発現状態を識別することもできる。

【0030】

本発明は、更に、成分（c）の特定のエフェクターユニット（図3）に親和性を有する一つまたはそれ以上の結合パートナー（成分（d））の相互作用を識別する方法に関する。

【0031】

本発明による“親和性”とは、試料成分が、成分（c）のエフェクターユニットと特異的に相互作用することを意味する。このような相互作用は、具体的には、特異的タンパク質-タンパク質および／またはタンパク質-核酸結合、そして更には、化学的活性物質とタンパク質エフェクターとの特異的結合であってよい。

【0032】

その方法は、次の処理工程、

（i）対合システム-エフェクター融合分子アレイと、少なくとも一つの成分（d）を含む分析される物質混合物とのインキュベーション、

（ii）成分（b）、成分（c）および成分（d）の複合体が形成されているアレイ位置の識別、

（iii）（ii）で識別される成分（b）、成分（c）および成分（d）の複合体の特性決定を含む。

【0033】

概して、形成される複合体は、標識[空隙(lacuna)]成分（d）によって検出される。更に、例えば、電子チップ（成分（a））を用いる場合、それら複合体は、電極またはその付近での酸化還元過程によってまたはインピーダンスおよび直流の測定値のような物理的パラメーターによって、または金チップ(gold chip)の場合、例えば、表面プラズモン共鳴測定値によって識別することができる。

【0034】

概して、成分（c）および成分（d）の部分複合体(subcomplexes)は、個々の識別される複合体から、例えば、温度を上昇させること、局所塩

濃度を変化させること、または好ましくは、電子結合パラメーターを調節することによる成分(b)へのハイブリダイゼーションの中断を用いて、逐次的に溶離される。次に、成分(d)を、当業者に知られている分析法によって特性決定する。

【0035】

核酸、タンパク質および／または化学的活性物質を標識する方法の例は、化学的および／または物理化学的、酵素、タンパク質、放射性同位体、非放射性同位体、毒素(toxin)、化学発光および／または蛍光の標識である。

【0036】

本発明による化学的標識に適する、当業者に知られている化学物質の例は、ビオチン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはストレプトアビジン(streptavidin)である。

【0037】

当業者に知られている本発明の化学修飾の例は、メチル基、アセチル基、リン酸基および／または単糖基の転移である。

本発明による、例えば、ELISAの形の酵素標識に適する、当業者に知られている酵素の例は、リンゴ酸ヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 Δ -5-ステロイドイソメラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロールリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、ルシフェラーゼまたはアセチルコリンエステラーゼである。

【0038】

本発明のタンパク質標識に適する、当業者に知られているタンパク質またはタンパク質フラグメントの例は、N-またはC末端(HIS)₆、myc、FLAG、Eタグ(Etag)、Streptタグ(Streptag)、ヘマグルチニン(hemagglutinin)、グルタチオントランスフェラーゼ(GST)、キチン含有インティン、マルトース結合タンパク質(MBP)、または抗

体または抗体の抗原結合部、例えば、F_vフラグメントである。

【0039】

本発明の放射性同位体標識に適する、当業者に知られている同位体の例は、³H、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³³P、³⁵S、¹⁴C、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁹Fe、⁷⁵Se、¹⁵²Eu、⁹⁰Y、⁶⁷Cu、²¹⁷Pb、²¹¹At、²¹²Pb、⁴⁷Scまたは¹⁰⁹Pbである。

【0040】

本発明の非放射性同位体標識に適する、当業者に知られている同位体の例は、²Hまたは¹³Cである。

本発明の毒素標識に適する、当業者に知られている毒素 (toxin) の例は、ジフテリア毒素、リシン (ricin) またはコレラ毒素である。

【0041】

本発明の化学発光標識に適する、当業者に知られている化学発光物質の例は、ルミノール標識、イソルミノール標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、シユウ酸エステル標識、ルシフェリン標識、アクリジニウム塩標識、イミダソール標識またはエクオリン標識である。

【0042】

本発明の蛍光標識に適する、当業者に知られている蛍光物質の例は、¹⁵²Eu、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、Cy3、Cy5、グリーン蛍光タンパク質 (GFP) およびその変異体 (YFP, RFP) またはフルオレスカミン (fluorescamine) である。

【0043】

結合した核酸は、EST (expressed sequence tags : 発現される配列標識) データベース、本発明の検出システムでのノーザンブロットによって、または検出時または特異的放出後、好ましくは、PCR、RT-PCRまたはクローニングによる先行増幅後に配列決定することによって識別することもまたは更に特性決定することもできる。

【0044】

当業者は、本発明によって標識するのに用いることができる、例えば、質量分析法、NMR分光法、熱量測定法または電位差測定法のような本明細書中に挙げられていない追加の標識法または分析法に精通している。

【0045】

本発明により、特に好都合な方法で、細胞の生理学的状態および細胞の生物学的過程を識別し、特性決定し、そして監視することが可能である。

したがって、本発明は、更に、少なくとも一つの試料成分（成分（d））、特に、試料の核酸および／またはタンパク質を発見するおよび／または識別するおよび／または特性決定するための、または細胞性または人工の結合パートナー、好ましくは、タンパク質、ペプチド、核酸、化学的活性物質、好ましくは、有機化合物、薬理的活性化合物、生産物保護物質（crop protection agents）、毒素、特に、毒物（poisons）、発癌性および／または催奇形性物質、除草剤、抗真菌剤または殺虫剤を発見するおよび／または識別するための、定常構造を有する領域（A）および領域（A）に隣接し且つ可変構造を有する領域（B）を含む、本発明の検出システム、本発明の方法または本発明の検出ユニットの使用に関する。

【0046】

これに関連して、転写因子、リプレッサーまたはエンハンサーの相互作用を研究すること、または例えば、キナーゼ、ホスファターゼ、GTPアーゼ、エステラーゼ、グリコシラーゼ、リパーゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ、ヒドロラーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼのような酵素と、それらの基質または調節物質、例えば、誘導物質、cAMPまたはcGMPのような二次メッセンジャーとの相互作用を研究することは、極めて興味深い。更に別の研究対象は、受容体およびそれらの結合パートナー、例えば、ホルモンおよびサイトカインなどである。

【0047】

例えば、一つの細胞種類で発現される遺伝子の全集団が、本発明の検出システムアレイ上に、それらのフサジーンによって（成分（c）として）示される場合、個々のタンパク質の結合パートナー（成分（d））は、直接標識、例えば、³⁵S同位体標識によって、アレイ上のスポットとして識別することができる。

【0048】

更に、成分(d)の結合パートナー、好ましくは、タンパク質を、サンドイッチ検定の形の標識成分(d)抗体によって識別することが可能である。この方法に具体的な利点は、それによって、相互作用性物質のプールからの、例えば、細胞抽出物中の成分(d)の特異的相互作用を特異的に識別することが可能であるということである。

【0049】

更に、エフェクターおよび成分(d)の相互作用への補因子、活性化物質および阻害物質の作用を、個々の因子の継続的な添加によって研究することも可能である。

【0050】

検出システムアレイの適用のもう一つ重要な分野は、酵素活性パターンの分析である。したがって、例えば、 $AT^{32}P$ をリン酸ドナーとして利用するキナーゼの基質を、アレイによって簡単な方法で識別することが可能である。

【0051】

アレイが、例えば、グリコーゲンシンターゼおよび／またはホスホリラーゼキナーゼをエフェクターとして含むフサジーンを含有する場合、アレイ上の *in vitro* 検定で、例えば、グリコーゲン代謝において重要な役割を生じるプロテインキナーゼに関して、基質としてのエフェクターの作用を研究することは可能である。このような *in vitro* 検定によって、例えば、プロテインキナーゼが、二つのエフェクターのリン酸化に関して、cAMPの添加によって活性化されることを示すことは可能である。更に、例えば、プロテインホスファターゼ1を加えることによる、個々のエフェクター上の該当するリン酸基の除去を研究することが可能である。

【0052】

本発明は、更に、成分(a)～(c)を含む検出システム、少なくとも一つの成分(d)、および適宜、成分(d)と相互作用する物質のような追加の物質、好ましくは、成分(d)抗体を含む結合体(*conjugate*)に関する。

【0053】

フサジーンを成分(c)として含有する結合体が好ましい。

成分(d)として含有される結合体は、好ましくは、タンパク質、ペプチド、特に、転写因子、受容体、酵素および／または化学的活性物質、好ましくは、有機化合物、薬理学的活性化合物、ホルモン、生産物保護物質、毒素、特に、毒物、発癌性および／または催奇形性物質、除草剤、抗真菌剤および／または殺虫剤である。

【0054】

次の実施例は、本発明を制限することなく、より詳細に記載するものである。

実施例1：典型的なFLAG、MYC、STREP融合ガラスチップの生成

ガラスチップ表面を、最初に、超音波浴中のアセトン中で標準的なスライドガラスを5分間脱脂することによってシラン化する（補足：微生物学用の染色槽）。自然乾燥後、それらスライドを、超音波浴中で0.1M NaOH溶液を用いて5分間処理する。

【0055】

この後、超音波浴中で蒸留水を用いて更に5分間洗浄する。最後に残るNaOH残留物を、蒸留水を用いた洗浄操作を繰り返すことによって除去する。この後、シラン化工程を行う。この目的には、95%濃度水性エタノール（エタノール：水；95.5 v：v）中の2～3%濃度（3-グリシジルオキシプロピル）トリメトキシシラン溶液を調製する。そのエタノール性シラン溶液を、濃酢酸を用いてpH4.9～5.2に調整する。添加および10分間の加水分解後、その調製されたシラン化溶液を超音波浴中で用いて、ガラス表面を2分間処理する。

【0056】

超音波浴中で100%エタノール溶液を用いた洗浄および自然乾燥の後、シラン化されたスライドガラスを、80℃で20分間乾燥させる。次に、そのシラン化ガラス表面上に、アミノ修飾された検出ユニット（成分b）を固定することができる。

【0057】

このようにしてチップ上に固定される検出ユニット（成分b）を、標準法によって合成する（下を参照されたい）。FLAG、MYCおよびSTREPエピト

ープをコードするRNAを、次のように、Roberts and Szostak (Proc.Natl.Aca
d.Sci USA, 1997) にしたがって製造する。DNA鋳型配列（配列番号：1）を
、Taqポリメラーゼ（Promega, Cat.No.: M166F）を用いたPCR反応に
おいて二つのプライマー（配列番号：2/3）を用いて増幅させる。

【0058】

【化1】

5'-GATTACAAGGACGACGACGACAAGGAACAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGATC-
TGGCAATGTGGAGCCACCCGCAGTTTGAGAA-3'

（配列番号：1）

5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAATGGATTACAAG-
GACGACGACGACAAGG-3'

（配列番号：2）

5'-AGCGGATGCTTTCTCAAACCTGCGGGTGGCTCCAC-3' （配列番号：3）

【0059】

得られた二本鎖DNA産物を、in vitro 転写（Promega, Cat.No.: P130
0）によって該当するRNA配列（配列番号：4）に転写する。

【0060】

【化2】

5'-GGACAAUUACUAUUUACAAUUACAUGGAUUACAAGGACGACGACGACAAG-
GAACAGAAGCUGAUCUCCGAAGAGGAUCUGGCAAUGUGGAGCCACCCGCA-
GUUUGAGAAAGCAUCCGCU-3'

（配列番号：4）

【0061】

更に、5'末端にリン酸基および3'末端にピュロマイシン残基（Pu）を
有するリンカー（配列番号：5）を、エピトープをコードしているRNA（配列
番号：4）の3'末端に連結するが、その連結反応は、T4DNAリガーゼ（M
BI, Cat.No.: EL0333）を用い且つ80：20%の比率で反応中に混合

される二つのスプリント (splint) 分子 (配列番号: 6 / 7) を用いて行われる。
。

【0062】

【化3】

5'-AAAAAAAAAAAAAAAAANFAAAAAAACCPu-3' (配列番号: 5)

5'-GCGCGCTTTTTTTTTTAGCGGATGC-3' (配列番号: 6)

5'-GCGCGCNTTTTTTTTTTAGCGGATGC-3' (配列番号: 7)

【0063】

更に、フルオレセイン誘導体 (NF, Interactiva) を、標準的なDNA固相合成によってリンカー中に包含させるが、その誘導体は、相補性成分 (b) との特異的ハイブリダイゼーションの場合、生じる蛍光によって結合結果を読み取ることを可能にする。

【0064】

次に、RNA (配列番号: 4) およびリンカー (配列番号: 5) を含む連結反応生成物を、変性6%濃度TBE尿素ゲルによって、非連結RNAから精製する。
。

【0065】

RNA (配列番号: 4)、エピトープエンコーディングペプチド (配列番号: 4) およびリンカー (配列番号: 5) を含むフサジーンを、Roberts and Szostak (Proc.Natl.Acad.Sci USA, 1997) にしたがって、in vitro 翻訳 (Promega, Cat.No.: L4960) 後、MgCl₂ (150mM) およびKCl (530mM) を含む翻訳混合物 (translation mixture) のインキュベーションを行って合成する。

【0066】

【化4】

MYC

MDYKDDDDKEQKLISEEDLAMWSHPQFEKASA (配列番号：4)

FLAG

STREP

【0067】

次に、このように合成されるフサジーンを、オリゴ-d (T) セルロース (Amersham Pharmacia Biotech. Cat.No: 27-5543-02) によって、続いて Strep-Tactin Sepharose (IBA, Cat.No: 2-1202-005) によって、均一になるまで精製する。

【0068】

用いられる検出ユニット (成分 (b)) は、それぞれに、配列 5' - T₁₅ - 3' を有する定常領域 (領域 A) および 8 個のヌクレオチドから成る可変領域 (領域 B) を含む。成分 (b) には、次の配列 (配列番号：8/9) を選択した。

【0069】

【化5】

成分 (b) - 1 : 5'-TTTTTTTTTTTTTTAGCGGATG-3' (配列番号：8)

成分 (b) - 2 : 5'-TTTTTTTTTTTTTTGTAGGCGA-3' (配列番号：9)

【0070】

ここで、成分 (b) - 1 は、その可変領域 B 内に、RNA (配列番号：4) およびリンカー (配列番号：5) を含む分子に相補的なヌクレオチド配列を有するが、成分 (b) - 2 には、可変領域 B に関して、その分子の標的配列への特異性がない。成分 (b) は、標準的な固相 DNA 合成によって製造された。3' 末端による固定化には、3' - アミノ修飾 C3CPG 支持体 (Glen Research, Cat.No.: 20-2950-10) を用い、そしてガラス 表面への 5' 末端結合には、5' - アミノ修飾因子 C6 ホスホルアミダイト (Glen Research, Cat.No.: 10-1906-90) を用いた。固定化には、成分 (b) - 1/2 の 50 μM (0.1 M NaOH 中) 溶液として、シラン化ガラス表面の位置 1 および 2 にそれ

ぞれ適用する。少なくとも2時間インキュベーション後、ガラス表面を、温水を用いて約5分間洗浄する。この後、5 x S S C緩衝液を用いてチップを10分間洗浄する。

【0071】

ポリA領域中のフルオレセインを用いて蛍光標識されたフサジーンは、5 x S S C緩衝液中のフサジーンを取り、それをチップに移し、カバーガラスでそれを覆い、4℃で5分間インキュベートすることによって、成分(b) - 1の相補性標的配列とハイブリッド形成する(位置1で)。次に、そのチップを、5 x S S C緩衝液を用いて室温で3回洗浄し、フルオレセイン蛍光を読み取る。最後に、0.5 x S S C緩衝液を用いた洗浄を繰り返し、蛍光強度を再度読み取る。成分(b) - 1との完全なハイブリダイゼーションの場合のみ、蛍光シグナルを検出することが可能であったということおよび成分(b) - 2の非特異的配列を含むフサジーンの相互作用はいずれにせよ起こらなかったということが示された。

【0072】

実施例2：タンパク質-タンパク質相互作用を検出するための典型的なF L A G、MYC、S T R E P融合ガラスチップの生成(蛍光標識された特異的抗F L A G抗体を用いたF L A Gエピトープの検出)

ガラスチップ表面を、最初に、超音波浴中のアセトン中で標準的なスライドガラスを5分間脱脂することによってシラン化する(補足：微生物学用の染色槽)。自然乾燥後、それらスライドを、超音波浴中で0.1 M N a O H溶液を用いて5分間処理する。

【0073】

この後、超音波浴中で蒸留水を用いて更に5分間洗浄する。最後に残るN a O H残留物を、蒸留水を用いた洗浄操作を繰り返すことによって除去する。この後、シラン化工程を行う。この目的には、95%濃度水性エタノール(エタノール：水；95.5 v：v)中の2~3%濃度(グリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン溶液を調製する。そのエタノール性シラン溶液を、濃酢酸を用いてp H 4.9~5.2に調整する。添加および10分間の加水分解後、その調製されたシラン化溶液を超音波浴中で用いて、ガラス表面を2分間処理する。

【0074】

超音波浴中で100%エタノール溶液を用いた洗浄および自然乾燥の後、シリシ化されたスライドガラスを、80℃で20分間乾燥させる。次に、そのシリシ化ガラス表面上に、アミノ修飾された検出ユニット（成分b）を固定することができる。

【0075】

チップ上に固定された成分（b）は、標準法によって合成した（下を参照されたい）。FLAG、MYCおよびSTREPエピトープをコードするRNAを、次のように、Roberts and Szostak (Proc.Natl.Acad.Sci USA, 1997) にしたがって製造する。DNA鋳型配列（配列番号：1）を、Taqポリメラーゼ（Promega, Cat.No.: M166F）を用いたPCR反応において二つのプライマー（配列番号：2/3）を用いて増幅させる。

【0076】

得られた二本鎖DNA産物を、in vitro 転写（Promega, Cat.No.: P1300）によって該当するRNA配列（配列番号：4）に転写する。

更に、5'末端にリン酸基および3'末端にピュロマイシン残基（Pu）を有するリンカー（配列番号：10）を、エピトープをコードしているRNA（配列番号：4）の3'末端に連結するが、その連結反応は、好ましくは、T4DNAリガーゼ（MBI, Cat.No.: EL0333）を用い且つ80:20%の比率で反応中に混合される二つのスプリント分子（配列番号：6/7）を用いて行われる。

【0077】

【化6】

5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCPU-3' （配列番号：10）

【0078】

次に、RNA（配列番号：4）およびリンカー（配列番号：5）を含む連結反応生成物を、変性6%濃度TBE尿素ゲルによって、非連結RNAから精製する。

【0079】

RNA（配列番号：4）、エピトープエンコーディングペプチド（配列番号：4）およびリンカー（配列番号：10）を含むフサジーンを、Roberts and Szostak (Proc.Natl.Acad.Sci USA, 1997) にしたがって、in vitro 翻訳（Promega, Cat.No.: L4960）後、MgCl₂（150 mM）およびKCl（530 mM）を含む翻訳混合物のインキュベーションを行って合成する。

【0080】

次に、このように合成されるフサジーンを、オリゴ-d（T）セルロース（Amersham Pharmacia Biotech. Cat.No: 27-5543-02）によって、続いて Strep-Tactin Sepharose（IBA, Cat.No: 2-1202-005）によって、均一になるまで精製する。

【0081】

用いられる検出ユニット（成分（b））は、それぞれに、配列5'-T₁₅-3'を有する定常領域（領域A）および8個のヌクレオチドから成る可変領域（領域B）を含む。成分（b）には、次の配列（配列番号：8/9）を選択した。

【0082】

【化7】

成分（b）-1：5'-TTTTTTTTTTTTTTAGCGGATG-3'（配列番号：8）

成分（b）-2：5'-TTTTTTTTTTTTTTGTAGGCGA-3'（配列番号：9）

【0083】

ここで、成分（b）-1は、その可変領域B内に、RNA（配列番号：4）およびリンカー（配列番号：10）を含む分子に相補的なヌクレオチド配列を有するが、成分（b）-2には、可変領域Bに関して、その分子の標的配列への特異性がない。成分（b）は、標準的な固相DNA合成によって製造された。3'末端による固定化の場合、3'-アミノ修飾C3CPG支持体（Glen Research, Cat.No.: 20-2950-10）を用いたが、ガラス表面への5'末端結合には、5'-アミノ修飾因子C6ホスホルアミダイト（phosphoramidite）を用いた。

t e) (Glen Research, Cat.No.: 10-1906-90) を用いた。固定化には、成分 (b) - 1 / 2 の $50 \mu\text{M}$ (0.1M NaOH 中) 溶液として、シリシ化ガラス表面の位置 1 および 2 にそれぞれ適用する。少なくとも 2 時間インキュベーション後、ガラス表面を、温水を用いて約 5 分間洗浄する。この後、 $5 \times \text{SSC}$ 緩衝液を用いてチップを 10 分間洗浄する。

【0084】

フサジーンは、 $5 \times \text{SSC}$ 緩衝液中の融合タンパク質を取り、それを個々のチップに移し、カバーガラスを用いてそれを覆い、 4°C で 5 分間インキュベートすることによって、相補性成分 (b) - 1 とハイブリッド形成する (位置 1)。次に、そのチップを、 $5 \times \text{SSC}$ 緩衝液を用いて室温で 3 回洗浄し、そして予め蛍光標識された (Cy5 Ab Labelling Kit, Amersham Pharmacia Biotech. Cat. No: PA35000) 抗FLAG抗体 (Sigma Immunochemicals, Cat.No.: F3040) の溶液を適用し、その蛍光を読み取る。最後に、 $0.5 \times \text{SSC}$ 緩衝液を用いた洗浄を繰り返し、蛍光強度を再度読み取る。成分 (b) - 1 との完全なハイブリダイゼーションの場合のみ、蛍光シグナルを検出することが可能であったということおよび成分 (b) - 2 の非特異的配列を含むフサジーンまたは蛍光標識された抗体の相互作用はいずれにせよ起こらなかったということが示された。

【0085】

実施例 3 : 電子的にアドレス可能なチップ (electronically addressable chip) 上に二つの異なったフサジーンを含む典型的なフサジーンアレイの生成

互いに明瞭に区別され且つアドレス可能な電子チップ上のハイブリダイゼーション実験において特性決定されうる二つのフサジーン (成分 (c)) を合成した。この目的には、実施例 2 からのフサジーン (成分 (c) - 1) の他に、別の、RNA (配列番号: 15)、エピトープエンコーディングペプチド (配列番号: 15) およびリンカー (配列番号: 10) を含む異なったフサジーン (成分 (c) - 2) を、鋳型DNA (配列番号: 11)、二つのプライマー (配列番号: 12 / 13) およびスプリント (配列番号: 14) を用いて合成する。

【0086】

【化8】

5'-GGTGC GCCGGTGCCGTATCCGGATCCGCTGGAACCGCGTGAACAGAAGCT-
GATCTCCGAAGAGGATCTGGCAATGTACAAGGACGACGACGACAAG-3'

(配列番号：11)

5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAATTACTATTTACAATTACAATGGGTGCGC-
CGGTGCCGTAT-3'

(配列番号：12)

5'-CTTGTCGTCGTCGTCCTTGTACATTGCCAGATCCT-3' (配列番号：13)

5'-TTTTTTTTTTCTTGTCGTC-3' (配列番号：14)

5'-GGACAAUUACUAAUUACAAUUGGGUGCGCCGGUGCCGUAUCCG-
GAUCCGCUUGGAACCGCGUGAACAGAAGCUGAUCUCCGAAGAGGAUCUGG-
CAAUGUACAAGGACGACGACGACAAG-3'

(配列番号：15)

MYC

MGAPVPYPDPLEPREQKLISEEDLANNKDDDDKASA (配列番号：15)

E-TAG

FLAG

【0087】

電子チップ上に固定された成分(b)は、標準的なDNA合成によって得られたビオチン標識成分(b) (配列番号：16～28)である。これに関連して、固定化は、3'末端へかまたは5'末端へのそれぞれの場合において行うことができる。挙げられる例では、成分(b)を、3'末端上のビオチン修飾によってチップ表面に結合させる。このためには、ビオチンTEG CPG支持体(Glen Research, Cat.No.: 20-2955-10)を、化学的DNA合成において用い、そして適当なビオチン修飾を有し且つ更に、15ヌクレオチド長さチミジン領域(領域A)および8ヌクレオチドの可変領域(領域B)を含む次の成分(b)

) を合成する。

【0088】

【化9】

成分 (b) - 3 : 5'-TTTTTTTTTTTTTTGGATGCTTBio-3' (配列番号 : 16)
 成分 (b) - 4 : 5'-TTTTTTTTTTTTTTCTTGTCGTBio-3' (配列番号 : 17)
 成分 (b) - 5 : 5'-TTTTTTTTTTTTTTGTAGGCGABio-3' (配列番号 : 18)

【0089】

成分 (b) - 3 および成分 (b) - 4 は、それらの具体的な可変領域 B に関して、適切な成分 (c) - 1 および成分 (c) - 2 それぞれに相補的である。成分 (c) - 5 には、いずれにせよ、可変領域 B に関して、成分 (c) - 1 および成分 (c) - 2 それぞれの相補性標的配列に特異性がない。

【0090】

成分 (b) - 3 ~ 5 は、50 mM ヒスチジン緩衝液中の具体的な成分 (b) の 1 μ M 溶液を調製し、それぞれの場合に 50 μ l の適当な成分 (b) を、3 x 3 の位置を有する半導体材料から成るチップに適用することによって固定される。固定化は、室温で行われた。チップ上の位置 (列、行) を次のように占有することが選択された。

【0091】

1, 1 : 成分 (b) - 3 ; 1, 2 : 成分 (b) - 4 ; 2, 1 : 成分 (b) - 3
 ; 2, 2 : 成分 (b) - 4 ; 3, 1 : 成分 (b) - 5 ; 3, 2 : 成分 (b) - 5
 ; 1, 3 : 成分 (b) - 3 ; 2, 3 : 成分 (b) - 4 ; 3, 3 : 成分 (b) - 5
 。

【0092】

配列番号 : 4 + 10 (成分 (c) - 3) および配列番号 : 15 + 10 (成分 (c) - 4) を含む連結された核酸またはフサジーン (成分 (c) - 1 および成分 (c) - 2) を、50 mM ヒスチジン緩衝液中にそれらを取り、適当なチップ位置 (列、行) において室温で具体的なハイブリダイゼーション実験を行うことによってハイブリッド形成させる。

【0093】

1, 1 : 成分(c) - 1 ; 1, 2 : 成分(c) - 2 ; 2, 1 : 成分(c) - 1 ; 2, 2 : 成分(c) - 2 ; 3, 1 : 成分(c) - 1 ; 3, 2 : 成分(c) - 2 ; 1, 3 : 成分(c) - 3 ; 2, 3 : 成分(c) - 4 ; 3, 3 : 成分(c) なし。

【0094】

次に、チップ上で生じたハイブリダイゼーション結果を、FLAGエピトープを特異的に認識し、しかも予め蛍光標識されている(Cy5Ab Labelling Kit, Amersham Pharmacia Biotech. Cat.No: PA35000) 抗FLAG抗体(Sigma Immunochemicals, Cat.No.: F3040) を、位置1, 1および1, 2に適用することによって特性決定する。E-tagエピトープを認識し、しかも予め蛍光標識されている(Cy5Ab 標識キット(Labelling Kit), Amersham Pharmacia Biotech. Cat.No: PA35000) E-tag抗体(Amersham Pharmacia Biotech. Cat.No: 279412-01) を、位置2, 1および2, 2に適用する。蛍光抗FLAG抗体または抗E-tag抗体を、抗体の可能な非特異的結合結果を検出するために、チップ位置3, 1 ; 3, 2 ; 1, 3 ; 2, 3および3, 3に適用する。

【0095】

いずれの場合も、蛍光強度を読み取ったが、蛍光標識された抗FLAG抗体を蛍光プローブとして用いて、相補性成分(c) - 1/2と成分(b)の完全なハイブリダイゼーションの場合、特異的に正の結合結果が、チップ位置1, 1および1, 2で生じたということが示された。抗E-tag抗体(位置2, 1および2, 2上)の相互作用の場合、蛍光強度の増加は、E-tagエピトープを装填される成分(c) - 2を有する位置2, 2でのみ検出可能であった。これら実験は、最初に、成分(c) - 1および-2が、適切な抗体によって特異的に認識されたことを明示している。対照実験は、最初に、二つの融合する遺伝子が、いずれにせよ、可変領域(領域B)内に成分(c) (位置3, 1および3, 2)への相補性のない成分(b)と非特異的に相互作用することができたかどうかの可能性を研究した。抗FLAG抗体を加えた後、検出する蛍光はなかったので、成

分(c)の非特異的ハイブリダイゼーションは生じなかったということが考えられる。更に、もう一つの対照実験は、抗FLAG抗体が、二本鎖核酸と相互作用する可能性を排除した。この目的には、ペプチドエピトープを含まない適切な成分(c)-3/4を、位置1, 3および2, 3に適用したが、抗FLAGまたは抗E-Tag抗体の添加は、蛍光変化が生じなかったことを示した。最後に、蛍光抗FLAGまたは抗E-Tag抗体には、いずれにせよ、一本鎖成分(b)(位置3, 3での実験)への親和性がないということを示すことも可能であった。要約として、それら結果を次の表に示す。

【0096】

【表1】

チップ位置	成分(c)/成分(b)	抗体	蛍光シグナル
1,1	1/3	FLAG	+
1,2	2/4	FLAG	+
2,1	1/3	E-Tag	-
2,2	2/4	E-Tag	+
3,1	1/5	FLAG	-
3,2	2/5	FLAG	-
1,3	3/3	FLAG	-
2,3	4/4	E-Tag	-
3,3	-/5	E-Tag	-

【0097】

次の図面は、本発明を制限することなく、より詳細に記載するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、支持体(1)成分(a)、およびその支持体に結合した検出ユニット成分であって、支持体表面にスペーサー(3)によって結合することができ、そして更に、定常領域(A)(4)および隣接する可変領域(B)(5)を含有する検出ユニット成分(b)(2)、および領域(A)(4)および(B)(

5) に相補的であり且つ適当なリンカー、例えば、ピューロマイシン (7) 含有核酸リンカー (8) の一部分と、リンカーに結合した核酸、ここではRNA (9) の一部分とから形成されている領域を含む成分 (c) (6) を含む本発明の検出システムを図式的に記載する。エフェクターユニット (10) は、核酸-ピューロマイシンリンカー (7, 8) に結合している。

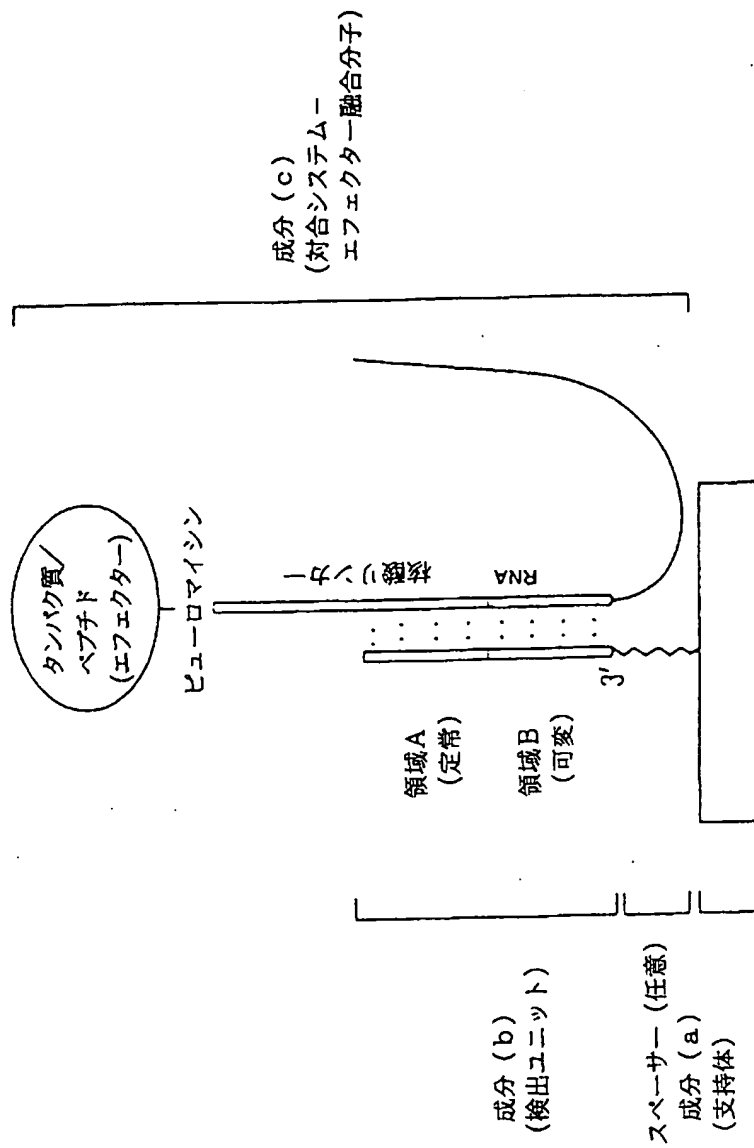
【図2】

図2は、成分 (a) ~ (c) を含む複合体の、成分 (c) 中に含有される標識 (11) による識別を図式的に記載する。

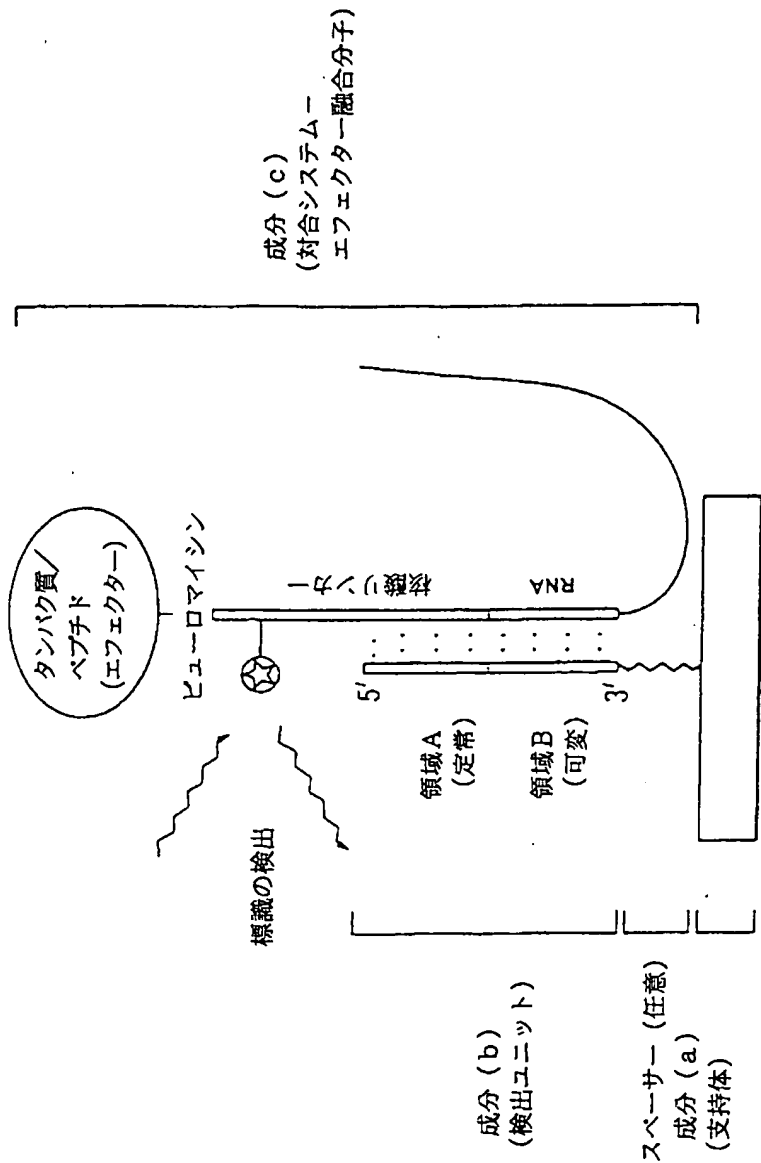
【図3】

図3は、成分 (a) ~ (d) を含む複合体の、ここではエフェクター抗体の例によって示される、例えば、成分 (d) 中に含有される標識 (12) による識別を図式的に記載する。

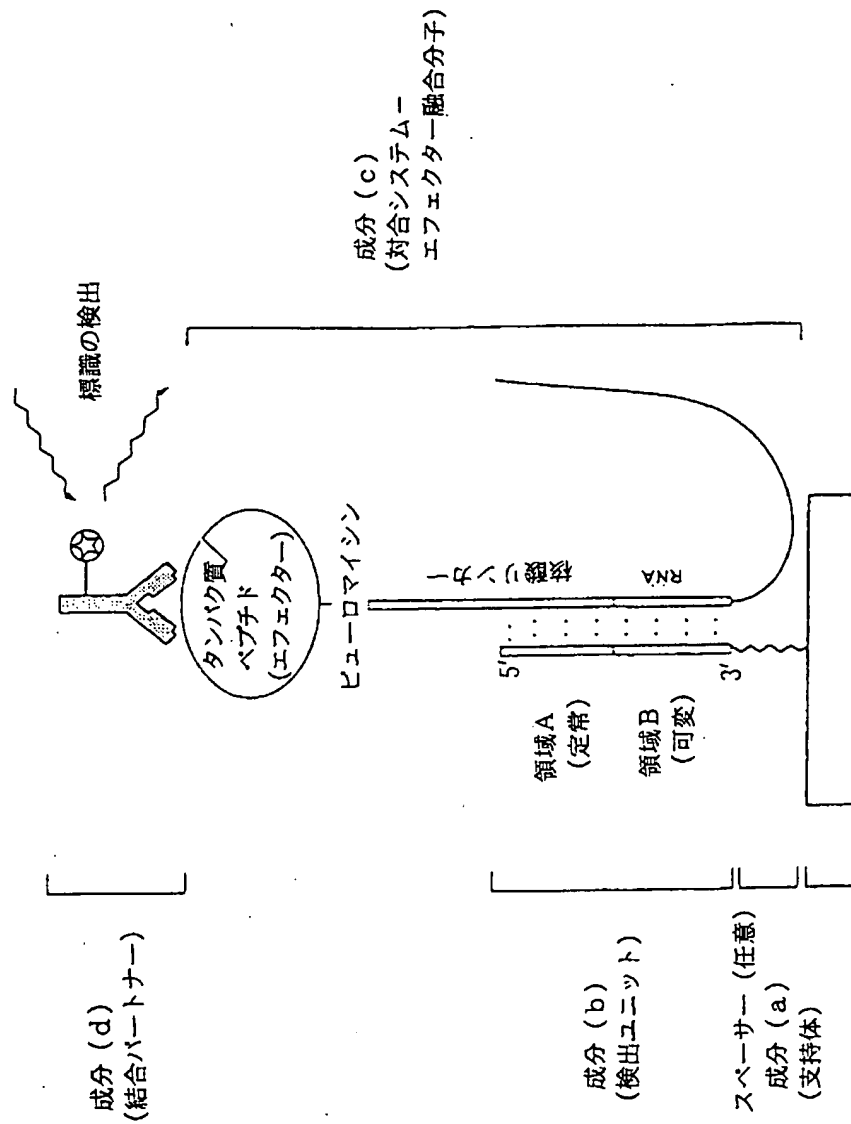
【図1】



【図 2】



【図3】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年7月16日(2001.7.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出システムであって、

(i) 支持体(成分(a))および

(ii) 該支持体に結合した少なくとも一つの検出ユニット(成分(b))であって、少なくとも5個のヌクレオチドを有する定常配列を有する領域(A)および領域(A)に隣接し且つ可変配列を有する領域(B)を含む対合システムを包括的に含む上記検出ユニット、および

(iii) それに結合し且つ該検出ユニット(成分(b))に相補的な配列を含む核酸-タンパク質受容体融合分子または核酸-タンパク質融合分子(成分(c))

を含む検出システム。

【請求項2】 領域(A)が、長さ5～約80ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である請求項1に記載の検出システム。

【請求項3】 領域(A)が、長さ5～約30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である請求項1に記載の検出システム。

【請求項4】 領域(B)が、長さ5～30ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である請求項1～3のいずれかに記載の検出システム。

【請求項5】 領域(B)が、長さ7または8ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体である請求項1～3のいずれかに記載の検出システム。

【請求項6】 ヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド(d)、リボヌクレオチド(r)または2-ヒドロキシメチルリボヌクレオチド(hmr)である請求項1～3に記載の検出システム。

【請求項7】 ヌクレオチド類似体が、p-RNA、CNAまたはPNAモノマーである請求項2に記載の検出システム。

【請求項8】 領域(A)がポリT鎖を含む請求項1～6のいずれかに記載の検出システム。

【請求項9】 一例として、領域(A)がT₇₋₁₅鎖を含む請求項1～6のいずれかに記載の検出システム。

【請求項10】 成分(c)が、核酸-ピューロマイシン誘導体および/または核酸-ピューロマイシン-タンパク質融合分子より選択される請求項1～9のいずれかに記載の検出システム。

【請求項11】 支持体が、セラミック、金属、特に、半導体、貴金属、ガラス、プラスチック、結晶質、または支持体、特に、該材料の薄層、またはセルロースのような(生体)分子フィラメント、構造タンパク質、または該材料の組合せから構成されている請求項1～10のいずれかに記載の検出システム。

【請求項12】 検出システムが、電子チップ上に組み立てられている請求項1～11のいずれかに記載の検出システム。

【請求項13】 請求項1～12のいずれかに記載の検出システムを製造する方法であって、

(i) 少なくとも5個のヌクレオチドを有する定常配列を有する領域(A)および領域(A)に隣接し且つ可変配列を有する領域(B)を含む検出ユニット(成分(b))を支持体(成分(a))に結合することによるアレイの製造であって、ここにおいて、それぞれのアレイ位置は、特定の領域Bを有する検出ユニットに割り当てることができる、および

(ii) 該検出ユニット(成分(b))と、該検出ユニット(成分(b))に相補的な配列を含む核酸-タンパク質受容体融合分子または核酸-タンパク質融合分子(成分(c))とのハイブリダイゼーションを含む上記方法。

【請求項14】 対合システム-エフェクター融合分子を含む溶液中の個々の成分を分別し且つ識別する方法であって、

(i) 対合システム-エフェクター融合分子ライブラリー(成分(c))ライブ

ラリー)の製造、

(ii) (成分(a))および領域(B)が可能な並べ換えを全て含む成分(b)を含むアレイ上の対合システム-エフェクター融合分子ライブラリー(成分(c)ライブラリー)のハイブリダイゼーションであって、領域(A)が少なくとも5個のヌクレオチドを含む個々の成分(b)それぞれを一つのアレイ位置に具体的に割り当てることを可能にするハイブリダイゼーション、

(iii) 成分(b)および成分(c)の複合体が形成されているアレイ位置の識別、

(iv) (iii)で識別される成分(b)および成分(c)の複合体の特性決定を含む上記方法。

【請求項15】 長さ5～80ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体の領域(A)を有する成分(b)を用いる請求項13および14のどちらかに記載の方法。

【請求項16】 長さ5～30の領域(B)を有する成分(b)を用いる請求項13～15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】 7または8ヌクレオチド長さの領域(B)を有する成分(b)を用いる請求項13～15のいずれかに記載の方法。

【請求項18】 ポリT鎖またはリボソーム結合部位に相補的な鎖から構成される領域(A)を用いる請求項10～13のいずれかに記載の方法。

【請求項19】 支持体が、セラミック、金属、特に、半導体、貴金属、ガラス、プラスチック、結晶質、または支持体、特に、該材料の薄層、またはセルロースのような(生体)分子フィラメント、構造タンパク質、または該材料の組合せから構成されている請求項13～18のいずれかに記載の方法。

【請求項20】 前記方法を電子チップ上で行う請求項13～19のいずれかに記載の方法。

【請求項21】 試料成分を、支持体に結合した検出ユニットに、電界によって成分(b)としてまたは成分(c)として結合する請求項13～20のいずれかに記載の方法。

【請求項22】 用いられる成分(c)が、核酸および/またはその類似体

から構成される対合システム-エフェクター融合分子である請求項13～21のいずれかに記載の方法。

【請求項23】 [空隙 (l a c u n a)] 中において、試料の少なくとも一つのRNA-タンパク質融合分子を、支持体に結合し且つ式 $3' - (X)_{7-8} - (T_{7-15}) - 5'$ (式中、Xは、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアノシンまたはシトシンより選択される任意のヌクレオチドである) を有する少なくとも一つの核酸に [空隙]、そして追加の工程において、結合しないまたは特異的に結合しない核酸を除去する請求項13～22のいずれかに記載の方法。

【請求項24】 [空隙] 中において、試料の少なくとも一つのRNA-タンパク質融合分子を、支持体に結合し且つ式 $3' - (X)_{7-8} - (T_{7-15}) - 5'$ (式中、Xは、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアノシンまたはシトシンより選択される任意のヌクレオチドである) を有する少なくとも一つの核酸に、電界によって結合し、そして追加の工程において、結合しないまたは特異的に結合しない核酸を、逆の極性を有し且つ第一工程の場合より低い電界強さを有する電界によって除去する請求項13～23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】 第一工程において、適当な核酸リンカーを、試料のRNA集団に、化学的にまたは適当なりガーゼによって融合した後、翻訳し、そして続いてRNA-リンカー-タンパク質融合の形成を引き起こし、第二工程において、RNA-リンカー-タンパク質融合分子を、本発明の検出システムの核酸に結合し、そして追加の工程において、結合していないまたは特異的に結合していない核酸を除去する請求項13～24のいずれかに記載の方法。

【請求項26】 式 $3' - (X)_{7-8} - (T_{27}GG) - 5'$ (式中、Xは、アデノシン、チミジン、ウラシル、グアノシンまたはシトシンより選択される任意のヌクレオチドである) を有する検出ユニット [空隙] 請求項13～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】 成分(c)の特定のエフェクターユニットに親和性を有する一つまたはそれ以上の結合パートナー(成分(d))の相互作用を識別する方法であって、

(i) 対合システム-エフェクター融合分子アレイと、少なくとも一つの成分

(d)を含む分析される物質混合物とのインキュベーション、

(ii) 少なくとも5個のヌクレオチドを含む定常領域(A)および可変領域(b)を有する成分(b)、成分(c)および成分(d)の複合体が形成されているアレイ位置の識別、

(iii) (ii)で識別される成分(b)、成分(c)および成分(d)の複合体の特性決定を含む上記方法。

【請求項28】 少なくとも一つの試料成分、特に、試料の核酸および／またはタンパク質を発見するおよび／または識別するおよび／または特性決定するための、または細胞性または人工の結合パートナー、好ましくは、タンパク質、ペプチド、核酸、化学的活性物質、好ましくは、有機化合物、薬理的活性化合物、生産物保護物質、毒素、特に、毒物、発癌性および／または奇形発生性物質、除草剤、抗真菌剤または殺虫剤を発見するおよび／または識別するための請求項17に記載の方法。

【請求項29】 少なくとも一つの成分(d)を直接的に標識する請求項23および28のどちらかに記載の方法。

【請求項30】 少なくとも一つのエフェクター結合成分(d)を、例えば、抗体のような標識された特異的結合パートナーを用いて検出する請求項27～29のいずれかに記載の方法。

【請求項31】 工程(ii)によるエフェクターと成分(d)との間の相互作用を、例えば、補因子、補酵素、活性化物質または阻害物質のような、相互作用に影響を与える追加の物質を加えることによって変更する請求項27～30のいずれかに記載の方法。

【請求項32】 酵素活性パターンを決定する請求項27～31のいずれかに記載の方法。

【請求項33】 検出システム(成分(a)～(c))および成分(d)を含む結合体。

【請求項34】 成分(d)がフサジーンである請求項33に記載の結合体。

【請求項35】 成分(d)が、タンパク質、ペプチド、特に、転写因子、受容体、または例えば、キナーゼ、ホスファターゼ、GTPアーゼ、エステラーゼ、グリコシラーゼ、リパーゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ、ヒドロラーゼ、イソメラーゼまたはリガーゼのような酵素であって、それらの基質または調節物質、例えば、誘導物質、cAMPまたはcGMPのような二次メッセンジャーなどと一緒に、および／または化学的活性物質、好ましくは、有機化合物、薬理的活性化合物、ホルモン、生産物保護物質、毒素、特に、毒物、発癌性および／または奇形発生性物質、除草剤、抗真菌剤および／または殺虫剤である請求項33または34のどちらかに記載の結合体。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/04791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 98 31700 A (GEN HOSPITAL CORP) 23 July 1998 (1998-07-23) cited in the application</p> <p>page 5; claims; figures 1,2,13,16 page 5 page 9, line 10-28 page 22, line 22 -page 24, line 7 page 26, line 10-20 page 37 page 64-68</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1,4, 7-11, 16-18, 21-29</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 April 2001

Date of mailing of the international search report

12/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patenthaus 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/EP 00/04791

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NIEMEYER C M ET AL: "OLIGONUCLEOTIDE-DIRECTED SELF-ASSEMBLY OF PROTEINS: SEMISYNTHETIC DNA-STREPTAVIDIN HYBRID MOLECULES AS CONNECTORS FOR THE GENERATION OF MACROSCOPIC ARRAYS AND THE CONSTRUCTION OF SUPRAMOLECULAR BIOCONJUGATES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 22, no. 25, 1994, pages 5530-5539, XP000645135 ISSN: 0305-1048 the whole document	21-29
X	DE 197 41 716 A (HOECHST AG) 25 March 1999 (1999-03-25) the whole document	1,4, 7-11, 15-18, 21-29
A	US 5 849 486 A (O'CONNELL JAMES PATRICK ET AL) 15 December 1998 (1998-12-15) the whole document	1-29
A	WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ;BARANY GEORGE (US); KEMPE MARIA (US); ZIRVI MONIB (US) 28 August 1997 (1997-08-28) page 1-8; figure 13 page 39-42	1-29
A	WO 93 17126 A (NEW YORK HEALTH RES INST) 2 September 1993 (1993-09-02) page 2; figures 1,4 page 8 page 17 page 31-35 page 38-41	1-29
P,X	WO 99 51773 A (PHYLOS INC) 14 October 1999 (1999-10-14) the whole document	1,4, 7-11, 15-18, 21-29
E	WO 01 16352 A (PHYLOS INC) 8 March 2001 (2001-03-08) the whole document	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern. nat. Application No.

PCT/EP 00/04791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
NO 9831700 A	23-07-1998	AU 6241998 A	07-08-1998
		CN 1251593 T	26-04-2000
		EP 0971946 A	19-01-2000
		ZA 9800489 A	08-09-1998
DE 19741716 A	25-03-1999	AU 1334099 A	12-04-1999
		BR 9812490 A	26-09-2000
		WO 9915893 A	01-04-1999
		EP 1018007 A	12-07-2000
US 5849486 A	15-12-1998	US 5632957 A	27-05-1997
		US 6017696 A	25-01-2000
		US 5605662 A	25-02-1997
		AU 723134 B	17-08-2000
		AU 6968996 A	17-04-1997
		BR 9610618 A	06-04-1999
		CA 2233238 A	03-04-1997
		CN 1202929 A	23-12-1998
		EP 0852617 A	15-07-1998
		JP 11512605 T	02-11-1999
		US 6099803 A	08-08-2000
		WO 9712030 A	03-04-1997
		US 6068818 A	30-05-2000
		US 6187642 B	13-02-2001
		US 6048690 A	11-04-2000
		US 6051380 A	18-04-2000
		AU 702773 B	04-03-1999
		AU 3507095 A	27-03-1996
		BR 9508908 A	28-10-1997
		CN 1164894 A	12-11-1997
		EP 0871888 A	21-10-1998
		FI 970957 A	07-05-1997
		JP 10505497 T	02-06-1998
		WO 9607917 A	14-03-1996
		AU 708677 B	12-08-1999
		AU 2966195 A	09-02-1996
		BR 9506035 A	14-10-1997
		CA 2169852 A	25-01-1996
		CN 1135220 A	06-11-1996
		EP 0717749 A	26-06-1996
		FI 961034 A	02-05-1996
		JP 9503307 T	31-03-1997
		NZ 289731 A	24-09-1998
		WO 9601836 A	25-01-1996
		AU 692800 B	18-06-1998
		AU 8125794 A	23-05-1995
		AU 8522798 A	10-12-1998
		AU 8522898 A	10-12-1998
		BR 9407952 A	26-11-1996
		CA 2175483 A	11-05-1995
		CN 1141078 A	22-01-1997
		EP 0727045 A	21-08-1996
		FI 961843 A	20-06-1996
		JP 9504910 T	13-05-1997
		NZ 275962 A	28-07-1998
		WO 9512808 A	11-05-1995
		US 5929208 A	27-07-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/04791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9731256 A	28-08-1997	AU 2799797 A	10-09-1997
		CA 2244891 A	28-08-1997
		EP 0920440 A	09-06-1999
WO 9317126 A	02-09-1993	AU 3728093 A	13-09-1993
		CA 2130562 A	02-09-1993
		EP 0675966 A	11-10-1995
		US 6103463 A	15-08-2000
WO 9951773 A	14-10-1999	AU 3463699 A	25-10-1999
		EP 1068356 A	17-01-2001
WO 0116352 A	08-03-2001	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード (参考)
G 0 1 N 33/58		G 0 1 N 37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	Z N A F
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, B J, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, C R, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, M D, MG, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, R O, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, Z A		
(72)発明者	ブルクシュタラー, ベトラ ドイツ連邦共和国デー12205 ベルリン, バーゼラー・シュトラッセ 142		
(72)発明者	コンツ, ディルク ドイツ連邦共和国デー65719 ホフハイ ム, ジントリンガー・シュトラッセ 46		
(72)発明者	ヴェルク, ウーヴェ ドイツ連邦共和国デー35039 マールブ ルク, カベッラーシュトラッセ 51		
(72)発明者	ビグノート, マルク ドイツ連邦共和国デー65812 バート・ ゾーデン, フライヘル・フォン・シュタイ ン・シュトラッセ 4		
(72)発明者	ヴァーグナー, ベーター ドイツ連邦共和国デー65510 イドシュ タイン, イム・アルテンホフ 4		
F ターム (参考)	2G045 AA35 BB14 BB50 BB51 DA13 FB01 FB02 FB07 FB12 4B024 AA11 AA19 AA20 CA09 CA20 HA14 HA20 4B029 AA07 AA23 AA27 BB15 BB20 CC01 CC03 CC08 FA12 FA15 4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR38 QR55 QR84 QS34 QS36 QS39 QX02 QX04		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.